苜蓿盲蝽气味结合蛋白基因 *Alin-OBP1* 的克隆及表达谱分析

谷少华，张雪莹，张永军*，吴孔明，郭予元
（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京，100193）

摘要：有证据表明昆虫气味结合蛋白（odorant binding proteins，OBPs）与其嗅觉识别密切相关，起着运输外界脂溶性气味分子通过嗅觉感器淋巴液到达嗅觉受体的关键作用。为了更好地了解 OBPs 在苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*（Goeze）嗅觉识别中的作用，本研究首次克隆了苜蓿盲蝽气味结合蛋白基因 *Alin-OBP1*（GenBank 序列号 GQ477022）。测序和序列分析结果表明，该基因开放阅读框长 438 bp，编码 145 个氨基酸，预测分子量为 15.69 kDa，等电点为 5.01，N-末端疏水区包含由 18 个氨基酸组成的信号肽。蛋白特征分析表明，该基因翻译后的蛋白质具有昆虫气味结合蛋白的典型特征，即氨基酸序列中有 6 个保守的半胱氨酸残基。利用 RT-PCR 和 Real-time PCR 技术对 *Alin-OBP1* 在苜蓿盲蝽成虫不同组织和各个发育阶段的表达水平进行了测定，结果显示 *Alin-OBP1* 几乎全部在触角中表达。不同发育阶段 *Alin-OBP1* 表达量不同，在 5 龄若虫和成虫阶段表达水平最高。结果提示 *Alin-OBP1* 可能在苜蓿盲蝽感受包括性信息素在内的外界化合物的过程中发挥着重要作用。

关键词：苜蓿盲蝽；气味结合蛋白；基因克隆；表达谱分析；发育阶段
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)05-0487-10

Cloning and expression pattern analysis of an odorant binding protein gene *Alin-OBP1* in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) (Hemiptera: Miridae)

GU Shao-Hua, ZHANG Xue-Ying, ZHANG Yong-Jun*, WU Kong-Ming, GUO Yu-Yuan (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.)

Abstract: In insects, there is now increasing evidence that the odorant binding proteins (OBPs) are involved in olfaction perception and play a key role in transporting hydrophobic odorants across the sensillum lymph to the olfactory receptors (ORs). In order to better understand the role of OBPs in the olfactory system of the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze), we cloned a cDNA encoding odorant binding protein 1 of *A. lineolatus* in the laboratory, which was named *Alin-OBP1* (GenBank accession no. GQ477022). The results of sequencing and sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) of *Alin-OBP1* was 438 bp in length, encoding 145 amino acids, the predicted molecular weight (MW) was 15.69 kDa, and the isoelectric point (pI) was 5.01. The predicted N-terminal hydrophobic region containing 18 amino residues displayed the characteristic features of a signal peptide. Protein signature analyses revealed that it shared typical structural features of odorant binding proteins with other insects, including six conservative cysteine residues. By RT-PCR and Real-time PCR methods, we determined the expression pattern of *Alin-OBP1* in different adult tissues and developmental stages of *A. lineolatus*. It was found that *Alin-OBP1* was dominantly expressed in the antenna of *A. lineolatus*. In addition, *Alin-OBP1* was expressed in various nymphal and adult stages at different expression levels and had higher expression level in the 5th instar nymphal and adult stages. The results suggest that *Alin-OBP1* may play a key role in the perception of sex pheromones and other chemical odorants in *A. lineolatus*.

Key words: *Adelphocoris lineolatus*; odorant binding protein; gene cloning; expression pattern analysis;

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目(2007CB0902)；国家科技支撑计划项目(2006BAD08A07)；财政部公益性行业专项(200803011)
作者简介：谷少华，男，1983 年 3 月生，河北藁城人，硕士，从事昆虫化学生态和分子生物学研究，Tel.：010-62816306；E-mail：gushaohua007@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author，Tel.：010-62895929；E-mail：yjzhang@ippcaas.cn
收稿日期 Received：2009-12-04；接受日期 Accepted：2010-04-26

developmental stage

盲蝽隶属于半翅目盲蝽科(Hemiptera: Miridae),是我国棉花生产上的一类重要害虫,每年在全世界都对棉花产量都造成巨大的损失(Hardee and Bryan 1997; Greene *et al*., 1999; Wu *et al*., 2002; Wu, 2007)。1997 年,我国开始商业化种植 Bt 棉花,到 2008 年,美国、中国、印度、澳大利亚、阿根廷、巴西、南非、墨西哥、哥伦比亚等国家种植 Bt 抗虫棉花已超过 1 500 万公顷(James, 2008)。种植 Bt 棉花有效地控制了棉铃虫等主要鳞翅目害虫的危害,化学农药使用量因此大幅度减少,棉田害虫地位随之发生了一系列演替,盲蝽种群数量剧增,危害加强,并且呈严重灾变趋势发生(Lu *et al*., 2008)。现在防治盲蝽主要靠化学农药,这不仅容易导致盲蝽抗药性的产生,而且对环境造成了巨大的破坏和污染,因此,有必要发展经济有效的、环境友好的防治方法。嗅觉系统对于昆虫的生存和繁衍至关重要(Field *et al*., 2000),可以特异性检测识别环境中的化学信号,从而引发相关的行为反应,如定位寄主、交配、选择产卵位点、躲避捕食者和外界有毒物质等(Kaissling *et al*., 1987; Breer *et al*., 1994; Field *et al*., 2000; Benton *et al*., 2009)。研究昆虫的嗅觉识别机制可以帮助我们设计人工合成物来干扰重要害虫的嗅觉识别,达到有效防治害虫的目的。

昆虫识别配偶释放的性信息素或植物的挥发性气味是通过位于昆虫嗅觉感器中的相关蛋白来实现的,包括气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、嗅觉受体(olfactory receptors, Ors)、气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs)和嗅觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)(Vogt and Riddiford, 1981; Vogt *et al*., 1985; Prestwich *et al*., 1989; Rybczynski, 1990; Rogers *et al*., 1999; Vosshall *et al*., 1999; Wanner *et al*., 2004; Hallem *et al*., 2006; Vogt *et al*., 2009)。另外,味觉受体(gustory receptors, GRs)也是昆虫识别外界气味的一种重要蛋白(Hallem *et al*., 2006)。其中 OBPs 的功能研究地最为深入,一般认为 OBPs 在昆虫触角感器淋巴液中高浓度的表达,起着溶解并运输外界脂溶性分子到达嗅觉神经元树突上的气味受体上,从而激活信号转导过程的作用(Krieger and Breer, 1999)。一些生理和行为学实验已经证明 OBPs 在昆虫感受外界气味分子中起关键作用。有报道指出,缺少表达 OBP76a/LUSH 的果蝇 *Drosophila* 突变体对其性信息素 11-*cis* vaccenyl acetate (VA)完全失去敏感性,证明 OBP76a/LUSH 对于果蝇感受其性信息素是必不可少的(Xu *et al*., 2005)。当缺失表达一个相关的 OBP 基因后,红火蚁 *Solenopsis invicta* 种群会产生多个蚁后,证明这个 OBP 蛋白在红火蚁感受蚁后的性信息素中起着重要作用(Krieger and Ross, 2002)。

苜蓿盲蝽是世界棉花生产的重要害虫,在我国及其他多个国家和地区都有分布,每年都对棉花生产造成严重损失(Wu *et al*., 2002; 陆宴辉和吴孔明, 2008)。苜蓿盲蝽为多食性害虫,危害寄主种类多达 29 科 125 种,每年对我国棉花、苜蓿等多种作物产量都造成严重损失(Wu *et al*., 2002; 陆宴辉和吴孔明, 2008)。目前苜蓿盲蝽主要采用化学防治,但防治效果较差,且有抗药性风险。近 30 年来,各国昆虫学家对昆虫感受寄主植物挥发物和性信息素的分子机制进行了深入研究,发现灵敏的嗅觉系统在昆虫寻找寄主、交配产卵过程中发挥着重要的作用,所以对昆虫的嗅觉识别进行有效干扰是防治害虫的又一有利途径(Plettner, 2002; Zhou *et al*., 2010)。有证据表明,包括苜蓿盲蝽在内的多种盲蝽的雌性成虫通过释放性信息素来吸引雄性成虫前来交尾(Millar 2005; Zhang and Aldrich, 2008)。另外,苜蓿盲蝽趋嗜植物花朵,尤其是对花期的棉花和紫花苜蓿有着明显的趋性(陆宴辉和吴孔明, 2008)。由此表明苜蓿盲蝽能够利用性信息素和寄主挥发物来进行交配和寄主定位。而在这个过程中灵敏的嗅觉系统无疑发挥着关键的作用(Field *et al*., 2000)。为了深入研究苜蓿盲蝽识别性信息素和寄主挥发物的分子机制,为防治苜蓿盲蝽提供新思路,本研究首次克隆了苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) 的一个 OBP 基因,并利用 RT-PCR 和 Real-time PCR 技术研究了该 OBP 基因的表达谱,以期为深入研究 OBP 在苜蓿盲蝽嗅觉识别过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

苜蓿盲蝽为本实验室饲养,饲养方法参照 Lu

等(2007)。在保鲜盒内用新鲜的四季豆饲喂，养虫室环境条件为 25 ~28℃，相对湿度 60% ~70%，光照 16:8(L:D)。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取试剂 Trizol、SuperScript III 第一链 cDNA 合成系统购于 Invitrogen；pGEM-T Easy 载体和 JM109 感受态细购于 Promega；Premix Ex Taq、DNA Marker DL2000、限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho* Ⅰ均购自 TaKaRa；X-gal 和 IPTG 购自 Amresco；Axygen 质粒提取和胶回收试剂盒购自北京华大中生；其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.3　RNA 的提取

取刚羽化的苜蓿盲蝽触角 150 对，用液氮研磨后，用 Trizol 试剂盒进行总 RNA 的提取。所有操作均按照试剂盒说明书进行，RNA 最后溶于 50 μL RNA-free 的 DEPC 水中。-80℃保存备用。

1.4　第一链 cDNA 的合成

将 2 μL 总 RNA，1 μL Oligo($dT)_{20}$，1 μL dNTP Mix，6 μL DEPC-H_2O，混于 PCR 管中，简单离心，65℃水浴 5 min，然后冰上终止反应2 min。再向 PCR 管中依次加入 2 μL 10 × RT Buffer，4 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，2 μL 0.1 mol/L DTT，1 μL RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor，1 μL SuperScript Ⅲ Reverse Transcriptase，简单离心，充分混匀。50℃反应 50 min。85℃，5 min，在冰上终止反应 2 min。简单离心，加 1 μL RNase H，然后 37℃反应 20 min。-20℃保存或直接用于 PCR 反应。

1.5　苜蓿盲蝽 OBP 基因的引物设计

苜蓿盲蝽 OBP 基因全长 cDNA 序列由筛选苜蓿盲蝽触角 cDNA 文库(由本实验室构建，未发表数据)得到，根据其开放阅读框序列，设计并合成引物：

正向引物：5′-GCggatccATGAACTCACTCATT-CCCGT-3′；

反向引物：5′-GCGctcgagTTAGAAGTCTGGAG-GACGC-3′。

为了便于以后进行原核表达，在正向、反向引物中分别设计了 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点(以小写字母表示)。以上引物由 Invitrogen 公司合成。

1.6　苜蓿盲蝽 OBP 基因的 PCR 扩增

以 SuperScript III Reverse Transcriptase 合成的第一链 cDNA 为模板，用上述基因特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为：ddH_2O 35.75 μL，Ex Taq Buffer 5 μL，dNTP 4 μL，第一链 cDNA 1 μL，正反向引物各 2 μL，总体积 50 μL。PCR 反应条件：95℃预变性 2 min，然后 94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共进行 35 个循环，最后 72℃延伸 10min。扩增完毕后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7　PCR 产物的胶回收和 TA 克隆

利用 Axygen 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物，PCR 产物经胶回收后克隆于 pGEM-T Easy 载体上(按试剂盒说明操作)，重组克隆载体 pGEM/OBP 转化 JM109 感受态细胞，然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上，37℃倒置培养 15 h。经蓝白斑筛选后，挑取 6 个阳性克隆在 LB 液体中(含 Amp)培养过夜，第 2 天用 Axygen 质粒提取试剂盒提取质粒，利用菌液 PCR 和 *Bam*HⅠ和 *Xho* Ⅰ双酶切的方法同时验证重组载体 pGEM/OBP 插入片段的大小。

1.8　序列的测定和分析

将菌液 PCR 和双酶切验证正确的重组质粒送 Invitrogen 公司进行测序。利用生物信息学方法对测序结果进行分析：序列相似性搜索使用 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 工具；核酸序列的基本物理性状分析预测软件用 (http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool)；亲脂性分析软件使用 BioEdit；NCBI 的 GenBank 序列提交软件使用 SEQUIN(4.50)。序列比对软件使用 ClustalX 1.83；进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中的邻位相连法(Neighbor-joining)，进行了 1 000 次重复构建，cut-off value 值为 70%。

1.9　RT-PCR 鉴定苜蓿盲蝽 OBP 基因的表达谱

Trizol 法提取不同龄期(1 ~5 龄若虫和成虫)，成虫不同组织(雄性触角、雌性触角、头、胸、腹、足、翅)的 RNA，在进行反转录之前，用 DNase I 消化 RNA 以除去残留的基因组 DNA。由 Invitrogen 的 SuperScript Ⅲ逆转录合成系统合成第一链 cDNA。操作按照说明书进行。其中每个组织的 RNA/cDNA 制备为 3 次重复。

在 RT-PCR 分析 OBP 基因的表达谱中，以 200 ng 的 cDNA 为模板，加入 10 × ExTaq Buffer 5 μL (含 Mg^{2+})，OBP 基因正反向引物各 1 μL (OBP-F：5′-ATGAACTCACTCATTCCCGTG-3′； OBP-R：5′-TTAGAAGTCTGGAGGACGCA-3′)，内参基因 β-actin 的正向和反向引物各 1 μL (β-actin-F：5′-GACATCCGTAAGGACCTGTA-3′； β-actin-R：5′-

CATCTGTTGGAAGGTGGAG-3′），2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL，ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μL（5 U/μL），加水至 50 μL。反应条件为：95℃ 2 min；95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。同时用清水作为对照。每个样品重复 3 次。

1.10 Real-time PCR 法鉴定苜蓿盲蝽 OBP 基因的表达谱

不同龄期和成虫不同组织 RNA 同 RT-PCR。采用 Taqman 方法进行 Real-time PCR 扩增，内参基因为苜蓿盲蝽的 β-actin 基因（GenBank 登录号 GQ477013），根据测序结果用 Primer Express 3.0（Applied Biosystems）软件设计引物及 Taqman 探针，探针 5′端为 FAM 标记，3′端为 TAMRA 标记。OBP 基因和 β-actin 的引物及探针序列如下：

OBP-Forward：5′-GAGGGCAGACGAACAAACCA-3′；

OBP-Reverse：5′-TCCTCCCGGCATTTGTTG-3′；

OBP-Probe：5′-FAM-CGCCATGGTAGCCAAAGCCT-TAMRA-3′；

β-actin-Forward：5′-CTCTGGAGGCACCACCATGTA-3′；

β-actin-Reverse：5′-GGGCAAGAGCGGTGATTTC-3′；

β-actin-Probe：5′-FAM-CCCGGAATCGCTGACAGGATGC-TAMR-3′。

上述设计好的引物及探针在上海基康生物技术公司合成。

起始模板为上述合成好的不同组织、不同部位的 cDNA，模板量都为 200 ng。Real-time PCR 采用 25 μL 反应体系，包括 Premix Ex Taq 12.5 μL（TaKaRa），正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，探针（10 μmol/L）0.5 μL，Reference Dye Ⅱ 0.5 μL，模板 cDNA 1 μL，无菌水 8.5 μL。反应条件为：94℃预变性 10 s；95℃ 20 s，60℃ 34 s，40 个循环。空白对照模板以水代替 cDNA。所有样品均重复 3 次。Real-time PCR 仪为 ABI Prism 7500 Fast Detection System（Applied Biosytems）。反应结束后收集 OBP 基因和 β-actin 的 Ct 值，利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量法（Livak and Schmittgen，2001）计算 OBP 基因在不同组织和不同发育阶段的表达量差异。不同组织间以 OBP 基因在雄性触角中的表达量为标准参量（calibrator）。不同龄期间以 OBP 基因在 1 龄若虫中的表达量为标准参量。

2 结果与分析

2.1 苜蓿盲蝽 OBP 基因的扩增、克隆与酶切鉴定

以第一链 cDNA 为模板，用基因特异性引物扩增苜蓿盲蝽 OBP 的开放阅读框，获得了长度为 450 bp 左右的产物（图 1），与预期基本一致。将目的片段胶回收后，连于 pGEM-T Easy 载体上后，转化 JM109 感受态细胞，对其进行菌液 PCR 和 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切验证（图 2），菌液 PCR 扩增出的条带和目的条带大小一致，双酶切切出的片段也和目的基因大小一致。

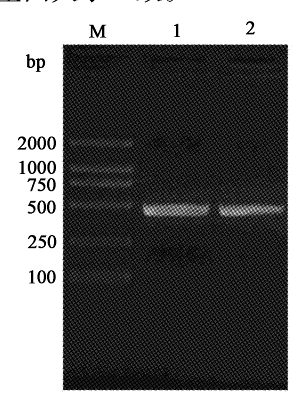


图 1 苜蓿盲蝽 OBP 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Adelphocoris lineolatus* OBP gene

M：DL2000；1，2：PCR 产物 PCR products

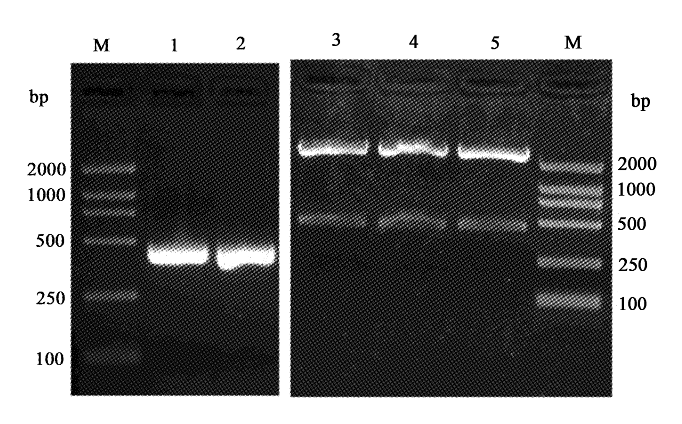


图 2 pGEM/*OBP* 的菌液 PCR（A）和 *Bam*H Ⅰ 与 *Xho* Ⅰ 双酶切验证（B）

Fig. 2 Identification pGEM/*OBP* by PCR（A）and digested with *Bam* H Ⅰ and *Xho* Ⅰ（B）

M：DL2000；1，2：菌液 PCR 鉴定 pGEM/*OBP*（PCR products of pGEM/*OBP*）；3，4，5：*Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切 pGEM/*OBP*（pGEM/*OBP* digested with *Bam*H Ⅰ and *Xho* Ⅰ）.

2.2 苜蓿盲蝽 OBP 基因及其编码蛋白分析

苜蓿盲蝽 OBP 基因的序列如图 3 所示，推定

的氨基酸序列位于核苷酸序列之下，方框内为保守的半胱氨酸位点。该基因已在 GenBank 中登录，序列号为 GQ477022。序列测定结果表明得到的苜蓿盲蝽 OBP 基因开放阅读框 ORF 全长 438 bp，编码 145 个 aa，预测分子量：15.69 kDa，等电点：5.01，用在线 Signa IP 3.0 Server 软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽预测，预测 N-末端疏水区包含由起始位置开始的 18 个 aa 组成的信号肽。该蛋白具有气味结合蛋白的一些典型特征，如都是可溶性的酸性小分子蛋白，序列中都含有 6 个高度保守的半胱氨酸位点。将得到的 OBP 基因最终命名为 *Alin-OBP1*。

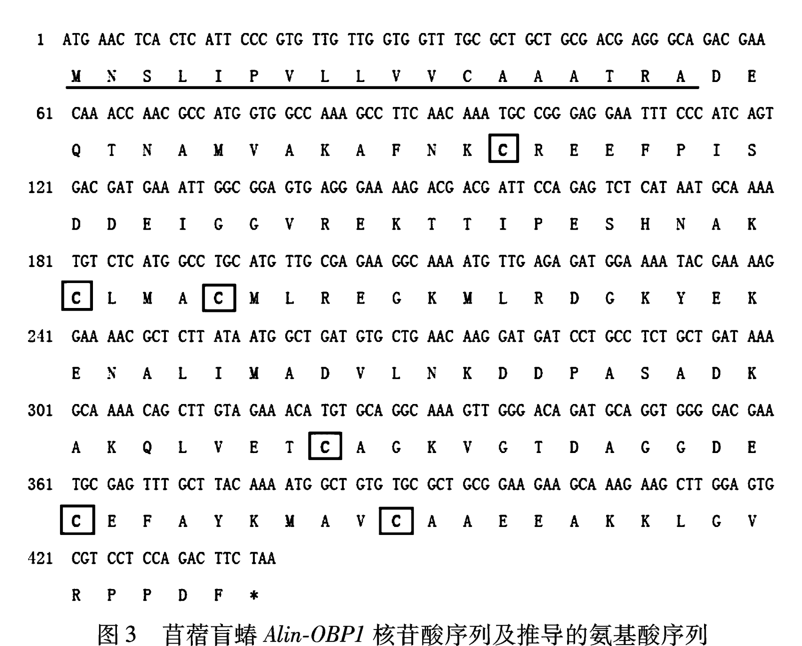


图 3　苜蓿盲蝽 *Alin-OBP1* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Alin-OBP1* gene

下划线示推导的信号肽 The predicted signal peptide sequence is underlined；方框内表示保守的半胱氨酸 Conserved cysteines are boxed.

用 Kyte 和 Doolittle 等（1982）的方法对推测的 Alin-OBP1 氨基酸序列进行亲脂性分析（图 4）。结果表明，Alin-OBP1 氨基酸序列中有 3 个亲脂性区域（A，B，C），尤其在第 60 ~ 70 位的氨基酸残基形成了一个明显的亲脂性口袋，可能是脂溶性气味分子的结合位点。

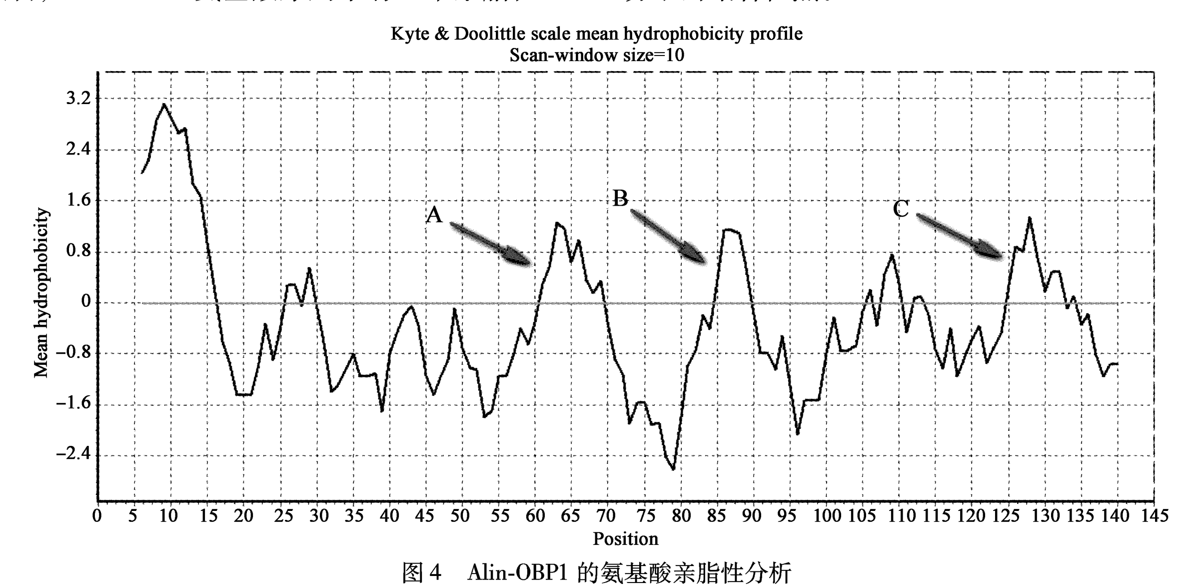


图 4　Alin-OBP1 的氨基酸亲脂性分析

Fig. 4　Predicted hydropathy profiles for the deduced amino acid sequences of the Alin-OBP1

对应氨基酸残基的亲和指数根据 Kyte 和 Doolittle（1982）的算法得到，正数代表亲脂性，负数代表亲水性。Values of hydrophobicity index are plotted against the amino acid residues using the method of Kyte and Doolittle (1982) with a window size of 10 amino acids. Positive values indicate hydrophobicity while negative values indicate hydrophilicity.

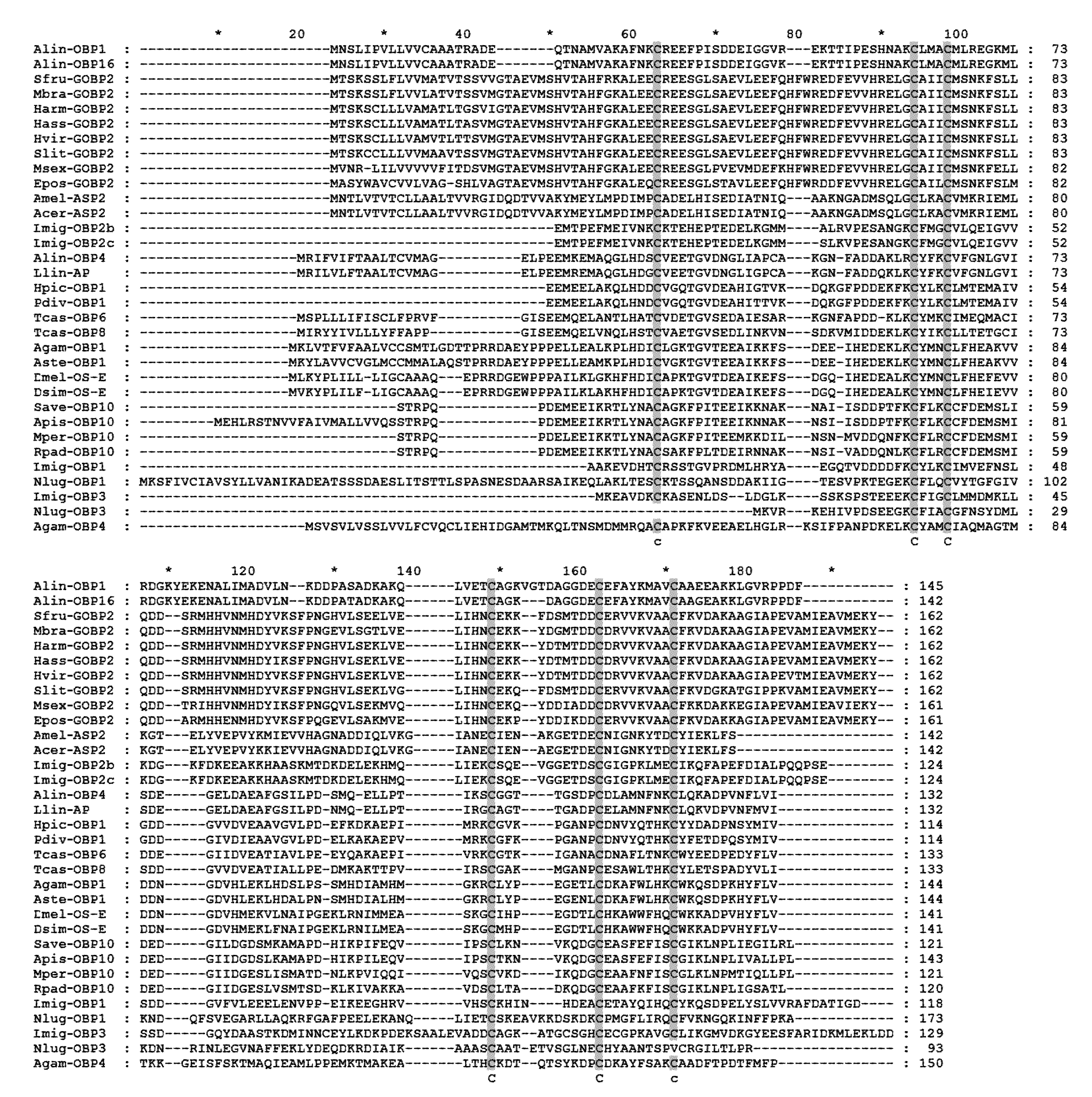


图 5 苜蓿盲蝽气味结合蛋白 Alin-OBP1 和其他已知昆虫 OBP 的多重联配

Fig. 5 Alignment of deduced amino acid sequence of Alin-OBP1 with homologous proteins from other insect species

'C' 示保守的半胱氨酸位点 Six conserved Cys residues are labeled by 'C'. 气味结合蛋白的来源与 GenBank 登录号如下：The species the OBPs originated from and their GenBank accession numbers are：Alin：苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* Goeze（Alin-OPP1：GQ477022；Alin-OBP4：GQ477025；Alin-OBP16：GQ477037）；Llin：美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*（Llin-AP：F091118）；Nlug：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Nlug-OBP1：ACI30679；Nlug-OBP3：ACI30681）；Mper：桃蚜 *Myzus persicae*（Mper-OBP10：FM242548）；Save：麦长管蚜 *Sitobion avenae*（Save-OBP10：FN293384）；Rpad：禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*（Rpad-OBP10：FN293387）；Apis：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*（Apis-OBP10：NM_001160053）；Amel：意大利蜜蜂 *Apis mellifera*（Amel-ASP2：AF393493）；Acer：中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*（Acer-ASP2：DQ449667）；Harm：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Harm-GOBP2：AJ278991）；Slit：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Slit-GOBP2：EF159979）；Sfru：草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（Sfru-GOBP2：AY669087）；Mbra：甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（Mbra-GOBP2：AF051144）；Epos：浅棕苹果蛾 *Epiphyas postvittana*（Epos-GOBP2：AF411460）；Msex：烟草天蛾 *Manduca sexta*（Msex-GOBP2：AF323972）；Hass：烟青虫 *Helicoverpa assulta*（Hass-GOBP2：AY351670）；Hvir：烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens*（Hvir-GOBP2：X96863）；Lmig：东亚飞蝗 *Locusta migratoria*（Lmig-OBP1：AF542076；Lmig-OBP2b：FJ959362；Lmig-OBP2c：FJ959363；Lmig-OBP3：CO832219）；Hpic：茶色长金龟 *Heptophylla picea*（Hpic-OBP1：AB025571）；Pdiv：异发丽金龟 *Phyllopertha diversa*（Pdiv-OBP1：AB026552）；Tcas：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（Tcas-OBP6：CM000280；Tcas-OBP8：CM000280）；Dmel：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（Dmel-OS-E：U02543）；Dsim：拟果蝇 *Drosophila simulans*（Dsim-OS-E：AM490961）；Agam：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Agam-OBP1：AF437884；Agam-OBP4：AY146731）；Aste：斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*（Aste-OBP1：GQ250942）. 下同 The same below.

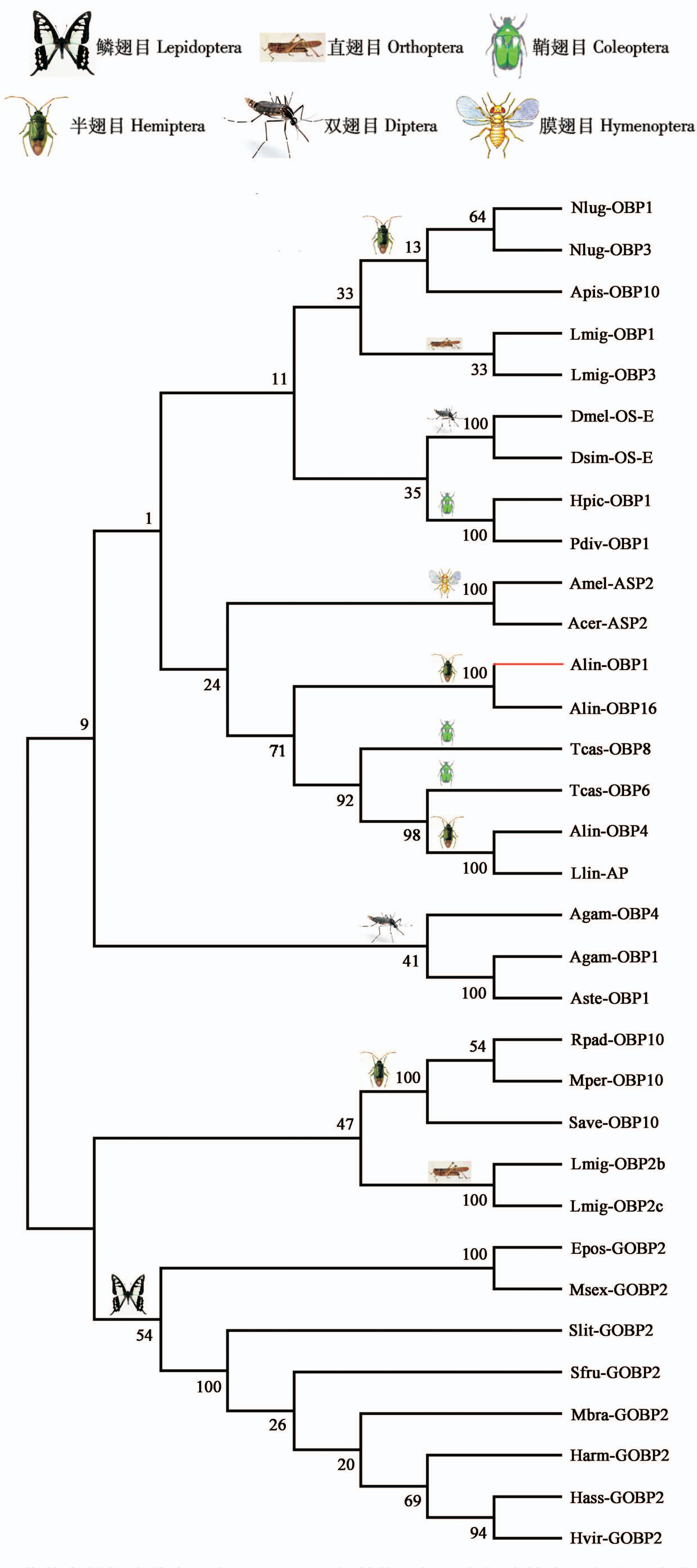


图 6　苜蓿盲蝽气味结合蛋白 Alin-OBP1 与其他已知昆虫气味结合蛋白的系统发育树

Fig. 6　Phylogenetic tree of Alin-OBP1 and OBPs from other different insect species

2.3 Alin-OBP1 与其他物种气味结合蛋白基因序列比对和系统发育关系分析

利用 BLAST 对苜蓿盲蝽气味结合蛋白进行同源性搜索，对搜索的结果用 ClustalX 1.83 进行氨基酸序列的多重联配(图5)，结果表明，苜蓿盲蝽 Alin-OBP1 与其他 32 种不同种类的昆虫的气味结合蛋白之间都有 6 个保守的半胱氨酸残基，揭示这些氨基酸对于昆虫感受外界气味起着重要的作用。Alin-OBP1 与其他 6 种半翅目昆虫，如褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*、桃蚜 *Myzus persicae*、麦长管蚜 *Sitobion avenae*、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的气味结合蛋白同源性不高，仅为 30% 左右，说明 Alin-OBP1 和这些半翅目昆虫气味结合蛋白在进化关系上离得很远。另一方面也和半翅目昆虫气味结合蛋白研究较少有直接关系。Alin-OBP1 与鳞翅目、膜翅目、直翅目、双翅目、鞘翅目昆虫的气味结合蛋白同源性更低，仅为 18% ~20% 之间，说明半翅目昆虫与其他目昆虫的气味结合蛋白在进化关系上离得较远。另外，8 种鳞翅目昆虫气味结合蛋白间的同源性高达 91.98%，这也从一定程度上说明亲缘关系越近，气味结合蛋白间的核苷酸序列相似性越高，同时暗示这些气味结合蛋白在鳞翅目昆虫的嗅觉识别中起着相似的功能。

应用 MEGA4.0 软件 Neighbor Joining(NJ) 法对包括 Alin-OBP1 在内的 33 种不同种类的昆虫气味结合蛋白进行系统发育进化树的构建(图6)。从系统发育树结果可以看出，鳞翅目昆虫气味结合蛋白 GOBP2 聚在同一个分支上，说明鳞翅目中的 GOBP2 基因来源于同一个祖先基因，最终分化成不同的基因型可能由于是不同自然选择压造成的。而半翅目、鞘翅目、双翅目、直翅目、膜翅目昆虫的气味结合蛋白则较为分化，位于不同的分支上。其中苜蓿盲蝽 Alin-OBP1，Alin-OBP4，Alin-OBP16 和美国牧草盲蝽触角蛋白 AP 位于一个大的分支上，说明苜蓿盲蝽和美国牧草盲蝽的进化关系较近，可能来源于共同的祖先。

2.4 *Alin-OBP1* 基因的转录表达谱分析

应用半定量 RT-PCR 技术分析 *Alin-OBP1* 基因在不同龄期、成虫不同组织之间的表达差异，结果表明，在成虫不同组织之间，*Alin-OBP1* 仅在触角中特异性表达，并且表达量在雄触角中高于雌触角中。在头、胸、腹、足、翅中不表达(图7：A)。在不同龄期之间，*Alin-OBP1* 都有表达，并且在 5 龄若虫和成虫中的表达量较其他龄期高(图7：B)。

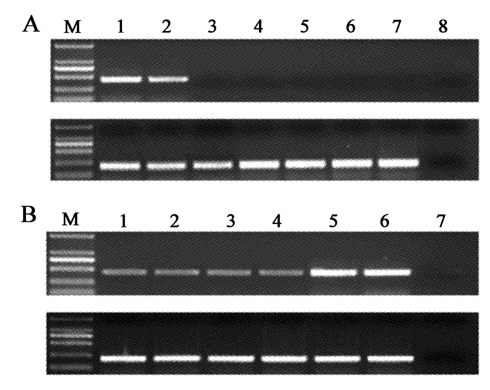


图7 苜蓿盲蝽 *Alin-OBP1* 的表达谱分析

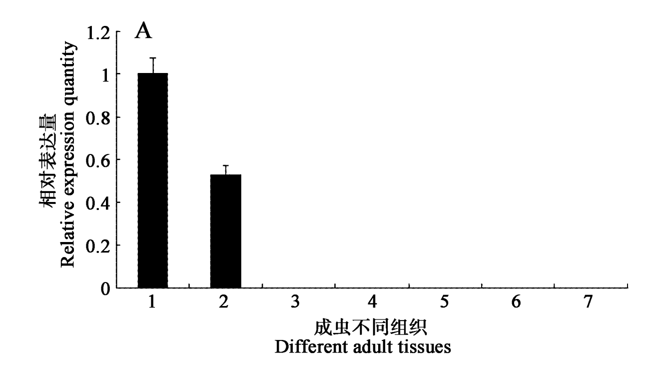
Fig. 7 Expression pattern of *Alin-OBP1* gene

A：*Alin-OBP1* 的组织特异性表达 Tissue-specific expression of *Alin-OBP1* gene. M：DL2000；1：雄性触角 Male antenna；2：雌性触角 Female antenna；3：头(去除触角) Head (without antenna)；4：胸 Thorax；5：腹 Abdomen；6：足 Leg；7：翅 Wing；8：清水 H_2O. B：*Alin-OBP1* 不同时期的特异性表达 Stage-specific expression of *Alin-OBP1* gene. M：DL2000；1：1 龄若虫 1st instar nymph；2：2 龄若虫 2nd instar nymph；3：3 龄若虫 3rd instar nymph；4：4 龄若虫 4th instar nymph；5：5 龄若虫 5th instar nymph；6：成虫 Adult；7：清水 H_2O.

为了验证 RT-PCR 的结果，同时更加精确地衡量 *Alin-OBP1* 的时空表达谱。我们利用 Real-time PCR 方法对 *Alin-OBP1* 在成虫不同组织、不同虫龄的表达量进行了测定。结果表明，*Alin-OBP1* 几乎全部在触角中表达，并且在雄虫触角中的表达量是在雌虫触角中表达量的 1.90 倍 (图8：A)。在其他组织表达量非常低，约为触角中表达量的千分之一。*Alin-OBP1* 在不同的发育阶段都表达，但是在 5 龄若虫和成虫阶段表达量较高，分别占整个表达量的 19.02% 和 47.76%，在成虫阶段 *Alin-OBP1* 的表达量最高，分别是 1 ~5 龄若虫期表达量的 8.51，5.53，5.18，4.65 和 2.50 倍(图8：B)。

3 讨论

昆虫与外界进行化学信息交流主要是通过嗅觉系统来完成的。气味结合蛋白 OBPs 在昆虫的嗅觉识别中发挥着至关重要的作用，其与脂溶性的气味物质结合是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应，对于昆虫与外界进行信息交流具有重要的意义(Vogt *et al.*, 1999)。本实验首次通过筛选触角 cDNA 文库的方法分离并克隆了一个编码苜蓿盲蝽气味结合蛋白 *Alin-OBP1* 的基因。序列分析表明，Alin-OBP1 具有气味结合蛋白的典型特征，如序列中有 6 个保守的半胱氨酸，为酸性的小分子蛋白。



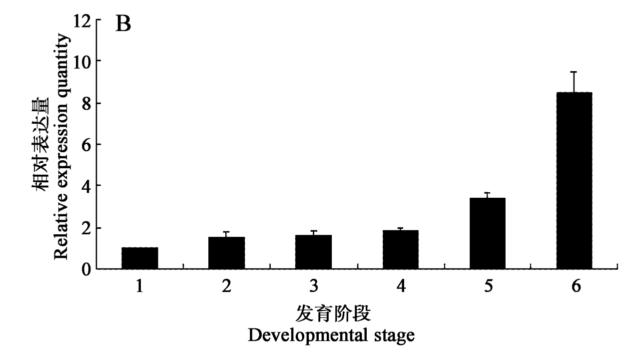


图 8　Real-time PCR 鉴定 *Alin-OBP1* 基因的表达图谱

Fig. 8　Relative expression level of *Alin-OBP1* measured by Real-time PCR

A：*Alin-OBP1* 在成虫不同组织间的相对表达量 Relative expression quantity of *Alin-OBP1* in different adult tissues. 1：雄性触角 Male antenna；2：雌性触角 Female antenna；3：头（去除触角）Head (without antenna)；4：胸 Thorax；5：腹 Abdomen；6：足 Leg；7：翅 Wing. B：*Alin-OBP1* 在不同发育阶段的相对表达量 Relative expression quantity of *Alin-OBP1* in different development stages. 1：1 龄若虫 1st instar nymph；2：2 龄若虫 2nd instar nymph；3：3 龄若虫 3rd instar nymph；4：4 龄若虫 4th instar nymph；5：5 龄若虫 5th instar nymph；6：成虫 Adult；7：清水 H_2O.

亲脂性分析表明 Alin-OBP1 氨基酸序列中有 3 个亲脂性区域，其中第 60 ~ 70 位的氨基酸残基形成了一个明显的亲脂性口袋，可能是脂溶性气味分子的结合位点。序列比对和进化树分析表明，苜蓿盲蝽 Alin-OBP1 与鳞翅目气味结合蛋白的同源性极低，仅为 18% ~ 20%；与其他半翅目昆虫如褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*、桃蚜 *Myzus persicae*、麦长管蚜 *Sitobion avenae*、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的气味结合蛋白同源性也不高，仅为 30% 左右。这表明 Alin-OBP1 和这些半翅目昆虫气味结合蛋白在进化关系上相距较远相关，另一方面也与半翅目昆虫气味结合蛋白研究的相对较少有关。

有大量的研究报道昆虫气味结合蛋白仅特异性的存在于触角当中(Vogt *et al*., 1999；Wang *et al*., 2003, 2004；Gong *et al*., 2009)，但是也有研究报道气味结合蛋白在其他部位也表达，比如 Calvello 等(2003, 2005)发现胡蜂 *Polistes dominulus*（膜翅目：胡蜂科）和大黄蜂 *Vespa crabro*（膜翅目：胡蜂科）的 OBP 除了在触角中表达外，在跗节和翅中也同时表达，Li 等(2008)报道埃及伊蚊 OBP 同时在在触角、喙、精囊、气门中表达。一般认为在触角中特异性表达的 OBP 蛋白跟识别昆虫的信息素相关，而同时在其他部位也有表达的 OBP 蛋白和识别普通气味有关。

有大量的研究报道昆虫气味结合蛋白仅特异性的存在于触角当中(Vogt *et al*., 1999；Wang *et al*., 2003, 2004；Gong *et al*., 2009)，但是也有研究报道气味结合蛋白在其他部位也表达，比如 Calvello 等(2003, 2005)发现胡蜂 *Polistes dominulus*（膜翅目：胡蜂科）和大黄蜂 *Vespa crabro*（膜翅目：胡蜂科）的 OBP 除了在触角中表达外，在跗节和翅中也同时表达，Li 等(2008)报道埃及伊蚊 OBP 同时在在触角、喙、精囊、气门中表达。一般认为在触角中特异性表达的 OBP 蛋白跟识别昆虫的信息素相关，而同时在其他部位也有表达的 OBP 蛋白和识别普通气味有关。

我们同时用 RT-PCR 和 Real-time PCR 方法研究了 *Alin-OBP1* 在成虫不同组织和不同发育阶段的表达谱，结果表明，*Alin-OBP1* 几乎全部在在触角中表达，并且在雄性触角的表达量要高于在雌性触角中的表达量，这说明 Alin-OBP1 可能是一个信息素结合蛋白(pheromone binding protein，PBP)，能够有效感受同种或异种个体之间的信息素物质。*Alin-OBP1* 在各个龄期都有表达，但是在 5 龄若虫和成虫期表达量最高。实际上，5 龄若虫期和成虫期的苜蓿盲蝽活动范围和取食量都比低龄若虫期有很大的提高，这时候高表达量的 *Alin-OBP1* 可能有助于苜蓿盲蝽寻找食物来源或者躲避天敌。为了进一步解析 *Alin-OBP1* 在苜蓿盲蝽嗅觉识别中的作用，我们需要获得大量的 Alin-OBP1 蛋白并对其生物功能进行深入研究。

参 考 文 献 (References)

Benton R, Vannice KS, Gomez-Diaz C, Vosshall LB, 2009. Variant lonotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136: 149 – 162.

Breer H, Raming K, Krieger J, 1994. Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochim. Biophys. Acta*, 1 224: 277 – 287.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 297 – 307.

Calvello M, Guerra N, Brandazza, D'Ambrosio C, Scaloni A, Dani FR, Turillazzi S, Pelosi P, 2003. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 1 933 – 1 943.

Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9: 545 – 551.

Gong ZJ, Zhou WW, Yu HZ, Mao CG, Zhang CX, Cheng JA, Zhu ZR, 2009. Cloning, expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Mol. Biol.*, 18: 405 – 417.

Greene JK, Turnipseed SG, Sullivan MJ, Herzog GA, 1999. Boll damage by southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) and tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) caged on transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. *J. Ecol. Entomol.*, 92: 941 – 944.

Hallem EA, Dahanuhar A, Carlson JR, 2006. Insect odor and taste receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 113 – 135.

Hardee DD, Bryan WW, 1997. Influence of *Bacillus thuringiensis*-transgenic and nectariless cotton on insect populations with emphasis on the tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). *J. Ecol. Entomol.*, 90: 663 – 668.

James C, 2008. Global status of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs No. 37: Preview. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, NY.

Kaissling KE, Strausfeld CZ, Rumbo ER, 1987. Adaptation processes in insect olfactory receptors. Mechanisms and behavioral significance. *Ann. N Y. Acad. Sci.*, 510: 104 – 112.

Krieger J, Breer H, 1999. Olfactory reception in invertebrates. *Science*, 286: 720 – 728.

Krieger MJ, Ross KG, 2002. Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*, 295: 328 – 332.

Kyte J, Doolittle RF, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157: 105 – 132.

Li S, Picimbon JF, Ji S, Kan Y, Qiao C, Zhou JJ, Pelosi P, 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, 372: 464 – 468.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Lu YH, Qiu F, Feng HQ, Li HB, Yang ZC, Wyckhuys KAG, Wu KM, 2008. Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. *Crop Prot.*, 27: 465 – 472.

Lu YH, Wu KM, 2008. Biology and Control of Cotton Mirids. Golden Shield Press, Beijing. [陆宴辉, 吴孔明, 2008. 棉花盲蝽蟓及其防治. 北京: 金盾出版社]

Lu YH, Wu KM, Guo YY, 2007. Flight potential of *Lygus lucorum* (Meyer-Dür) (Heteroptera: Miridae). *Environ. Entomol.*, 36: 1 007 – 1 013.

Millar JG, 2005. Pheromones of true bugs. *Top. Curr. Chem.*, 240: 37 – 84.

Plettner E, 2002. Insect pheromone olfaction: New targets for the design of species-selective pest control agents. *Curr. Med. Chem.*, 9: 1 075 – 1 085.

Prestwich GD, Graham SC, Handley M, Latli B, Streinz L, Tassayco ML, 1989. Enzymatic processing of pheromones and pheromone analogs. *Experientia*, 45: 263 – 270.

Rogers ME, Jani MK, Vogt RG, 1999. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, 202: 1 625 – 1 637.

Rybczynski R, Vogt RG, Lerner MR, 1990. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 265: 19 712 – 19 715.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24: 481 – 495.

Vogt RG, Miller NE, Litvack R, Fandino RA, Sparks J, Staples J, Friedman R, Dickens JC, 2009. The insect SNMP gene family. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 448 – 456.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD, 1985. Kinetic properties of a pheromone degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8 827 – 8 831.

Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96: 725 – 736.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 115 – 124.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Molecular cloning and bacterial expression of pheromone binding protein in the antennae of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 57: 15 – 27.

Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, Isman MB, Feng Q, Plettner E, 2004. Analysis of the insect *os-d*-like gene family. *J. Chem. Ecol.*, 30: 889 – 911.

Wu KM, 2007. Environmental impact and risk management strategies of Bt cotton commercialization in China. *J. Agric. Biotech.*, 15: 1 – 4.

Wu KM, Li W, Feng HQ, Guo YY, 2002. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China. *Crop Prot.*, 21: 997 – 1 002.

Xu P, Atkinson R, Jones DN, Smith DP, 2005. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45: 193 – 200.

Zhang QH, Aldrich JR, 2008. Sex pheromone of the plant bug, *Phytocoris calli* Knight. *J. Chem. Ecol.*, 34: 719 – 724.

Zhou JJ, Field LM, He XL, 2010. Insect odorant-binding proteins: Do they offer an alternative pest control strategy? *Outlooks on Pest Management*, 21(1): 31 – 34.

（责任编辑：赵利辉）